





**FREMGANGSMAATE FOR FREMSTILLING AV ALKALIMETALL- ELLER  
JORDALKALIMETALLSALTER AV N5-FORMYL-5,6,7,8-  
TETRAHYDROFOLSYRE****Publication number:** NO172492 (B)**Publication date:** 1993-04-19**Inventor(s):** MARAZZA FABRIZIO; TODERI NANDO**Applicant(s):** SAPEC FINE CHEMICALS [CH]**Classification:****- international:** C07D457/04; C07D; C07D457/00; (IPC1-7): C07D457/04**- European:****Application number:** NO19910001441 19910412**Priority number(s):** CH19900001257 19900412**Also published as:** NO911441 (A) NO172492 (C)Abstract not available for **NO 172492 (B)**

---

Data supplied from the **esp@cenet** database — Worldwide

**FREMGANGSMAATE FOR FREMSTILLING AV ALKALIMETALL- ELLER  
JORDALKALIMETALLSALTER AV N5-FORMYL-5,6,7,8-  
TETRAHYDROFOLSYRE****Publication number:** NO172492 (C)**Publication date:** 1993-07-28**Inventor(s):** MARAZZA FABRIZIO; TODERI NANDO**Applicant(s):** SAPEC FINE CHEMICALS [CH]**Classification:****- international:** C07D457/04; C07D; C07D457/00; (IPC1-7): C07D457/04**- European:****Application number:** NO19910001441 19910412**Priority number(s):** CH19900001257 19900412**Also published as:** NO911441 (A) NO172492 (B)Abstract not available for **NO 172492 (C)**

---

Data supplied from the **esp@cenet** database — Worldwide



NORGE

(12) PATENT

(19) NO

(11) 172492

(13) C

(51) Int Cl<sup>5</sup> C 07 D 457/04

## Styret for det industrielle rettsvern

|                      |          |                                      |                       |
|----------------------|----------|--------------------------------------|-----------------------|
| (21) Søknadsnr       | 911441   | (86) Int. inng. dag og søknadsnummer |                       |
| (22) Inng. dag       | 12.04.91 | (85) Videreføringsdag                |                       |
| (24) Løpedag         | 12.04.91 | (30) Prioritet                       | 12.04.90, CH, 1257/90 |
| (41) Alm. tilgj.     | 14.10.91 |                                      |                       |
| (44) Utlegningsdato  | 19.04.93 |                                      |                       |
| (45) Meddelelsesdato | 28.07.93 |                                      |                       |

|                  |                                                           |
|------------------|-----------------------------------------------------------|
| (73) Patenthaver | Sapac SA fine chemicals, P.O. Box 234, CH-6903 Lugano, CH |
| (72) Oppfinner   | Fabrizio Marazza, Vico Morcote, CH                        |
|                  | Nando Toderi, Agno, CH                                    |
| (74) Fullmektig  | Kari O. Hanssen, Bryns Patentkontor AS, Oslo              |

(54) Benevnelse      Fremgangsmåte for fremstilling av alkalimetall- eller jordalkalimetallsalter av N<sup>5</sup>-formyl-5,6,7,8-tetrahydrofolsyre

(56) Anførte publikasjoner    NO A 894499.

(57) Sammendrag

Alkalimetall- eller jordalkalimetallsalter av N<sup>5</sup>-formyl-5,6,7,8-tetrahydrofolsyre oppnås ved at man blander 5,6,7,8-tetrahydrofolsyre med minst ett oppløsningsmiddel og denne blandingen blandes med formamid som formyleringsmiddel og oppvarmes til en temperatur på 45°C til 75°C. Etter formyleringen fortynnes blandingen med vann og blandes med en tilsvarende alkalimetall- eller jordalkalimetallbase i en slik mengde at det oppnås en målt pH-verdi på 7,5 til 10,0. Til denne blandingen, som tilsvarer 1 volumdel, tilsettes 1,5 til 3 volumdeler av minst ett polart, med vann blandbart, organisk oppløsningsmiddel. Det utfelte alkalimetall- eller jordalkalimetallsaltet av N<sup>5</sup>-formyl-5,6,7,8-tetrahydrofolsyre fraskilles og omkrystalliseres fra vann.

Foreliggende oppfinnelse vedrører en regioselektiv formyleringsfremgangsmåte for fremstilling av alkalimetall- eller jordalkalimetallsalter av N<sup>5</sup>-formyl-5,6,7,8-tetrahydrofolsyre, også betegnet folinsyre eller leukoforin.

5

I forbindelse med foreliggende oppfinnelse forkortes 5,6,7,8-tetrahydrofolsyre delvis med betegnelsen THF.

10

Den i naturen forekommende N<sup>5</sup>-formyl-THF er et relevant molekyl i metabolismen i levende celler som "C<sub>1</sub>"-overførende kofaktor i forbindelse med biosyntesen av nukleinsyrer og proteinogene aminosyrer.

15

N<sup>5</sup>-formyl-THF er biologisk aktiv; egenskapene utnyttes idag hovedsakelig innenfor følgende tre områder:

20

a) som modulator for enzym-inhibitorer ved visse kreft-kjemoterapier, f.eks. som modulator for 5-fluorurasil-metabolitter ved inhiberingen av thymidilat-syntetase;

25

b) som reaktiveringsfaktor ("rescue factor") innenfor onkologien etter behandlingen av tumorer med DHFR-inhibitorer (dihydrofolatreduktase-inhibitorer, såkalte "antifolater");

30

c) som vitamin ved behandlingen av megaloblastiske anemier og generelle mangeltilstander på reduserte folater, f.eks. under svangerskapet eller som geriatriisk preparat.

35

Utgangsmaterialet THF fremstilles som regel fra folsyre. I litteraturen er den katalytiske hydreringen med Pt/Pd og hydrogengass beskrevet (J.M. Scott, Meth Enzymol (1989) 66, 437), på samme måte som reduksjon med alkaliborhydrid (C. Temple et al., J med Chem (1979) 22, 731) og den trinnvise reduksjonen først med natriumditionitt til dihydrofolsyre, deretter med natriumborhydrid til tetrahydrofolsyre (E. Khalifa et al., Helv Chim Acta (1980) 63, 2554).

Kjemiske fremgangsmåter for formylering av THF er kjente. Formyleringer av THF til N<sup>5</sup>-formyl-THF som hittil er kjent finner enten sted ved hjelp av ren maursyre eller ved hjelp  
5 av maursyreestere.

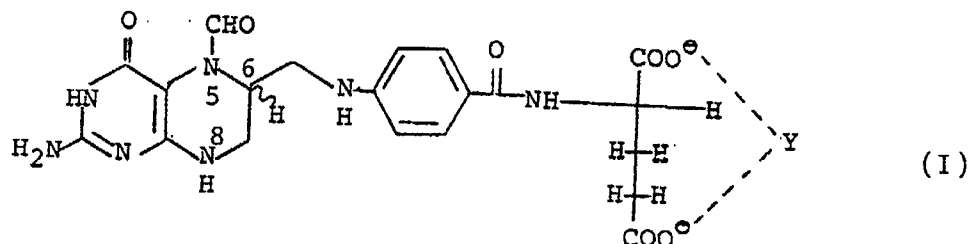
Ved noen formyleringsreaksjoner er regioselektiviteten utilstrekkelig, slik at det ved siden av det ønskede N<sup>5</sup>-formyl-produktet også dannes et N<sup>10</sup>-formyl-produkt og/eller  
10 et N<sup>5</sup>, N<sup>10</sup>-diformyl-produkt. Disse uønskede produktene reduserer utbyttene og vanskeliggjør samtidig rensingen av det ønskede produktet. Ved andre formyleringsreaksjoner dannes riktignok et regioselektivt produkt, imidlertid er dette forurenset med kjente biprodukter av ukjent struktur,  
15 som bare kan fraskilles med dyre og kompliserte rensefremgangsmåter, f.eks. kromatografifremgangsmåter.

De i noen av de nevnte fremgangsmåtene som kondensasjonsmidler anvendte karbodiimidene er dyre og derfor av kostnadsgrunner bare anvendbare i laboratoriemålestokk; de er  
20 dessuten heller ikke lett fraskillbare og krever kompliserte opparbeidelses- og isoleringsfremgangsmåter. Når det gjelder dette vises det også til følgende litteraturreferanser: R.G. Moran et al., Analytical Biochemistry 122, 70-78 (1982) og  
25 P.A. Charlton et al., J. Chem. Soc. Perkin Trans. I 1985, 1349-1353.

Det er en oppgave ved foreliggende oppfinnelse å tilveiebringe en enkel, billig fremgangsmåte for regioselektiv  
30 formylering av 5,6,7,8-tetrahydrofolsyre til N<sup>5</sup>-formyl-5,6,7,8-tetrahydrofolsyre. I tillegg skal produktet oppnås i høyt utbytte og være enkelt å isolere og å krystallisere, slik at det ikke må anvendes omstendelige og dyre kromatografifremgangsmåter.

35 Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer en fremgangsmåte for

fremstilling av alkalimetall- eller jordalkalimetallsalter av N<sup>5</sup>-formyl-5,6,7,8-tetrahydrofolsyre med formel I



hvor

Y betyr to alkalimetallkationer eller ett jordalkalimetallkation, spesielt  $\text{Ca}^{2+}$  eller  $\text{Mg}^{2+}$ , kjennetegnet ved at man blander 5,6,7,8-tetrahydrofolsyre med minst ett oppløsningsmiddel L<sub>1</sub>, deretter blandes denne blanding A med formamid som formyleringsmiddel, deretter oppvarmes den derved fremstilte blanding B til en temperatur på 45°C til 75°C, fortrinnsvis på 55°C til 65°C, spesielt 60°C, deretter avkjøles denne blanding B til romtemperatur og blandes med vann, deretter tilsettes en tilsvarende alkalimetall- eller jordalkalimetallbase, eksempelvis i form av et hydroksyd, karbonat eller hydrogenkarbonat, i en slik mengde at det oppnås en målt pH-verdi på 7,5 til 10,0, fortrinnsvis 9,0, deretter tilsettes til denne blanding C, som tilsvarer en volumdel, 1,5 til 3 volumdeler av minst ett polart, med vann blandbart, organisk oppløsningsmiddel L<sub>2</sub>, fortrinnsvis etanol eller aceton, fortrinnsvis under omrøring ved en temperatur på 0°C til 10°C, spesielt i 30 til 90 minutter, og deretter fraskilles det utfelte alkalimetall- eller jordalkalimetallsaltet med formel I og omkrystalliseres fra vann.

Foretrukne utførelsesformer av oppfinnelsen er definert i underkravene.

Formyleringsreaksjonen ifølge oppfinnelsen varer, avhengig av den valgte reaksjonstemperaturen, vanligvis 10 til 20 timer. Vanligvis overvåkes formyleringsreaksjonen rutinemessig med

HPLC. Det er et faktum at med formyleringsfremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse oppnås det ønskede produktet N<sup>5</sup>-formyl-THF tilnærmet enhetlig og i meget ren form. Produktet utfelles og omkrystalliseres på enkel måte i form av et tilsvarende alkalimetall- eller jordalkalimetallsalt.

Det etterfølgende eksempelet tjener til illustrasjon av foreliggende oppfinnelse.

#### Eksempel

45 g 5,6,7,8-tetrahydrofolsyre ble under omrøring tilsatt til en blanding av 300 ml avgasset formamid og 3 ml merkpto-  
etanol under en nitrogenatmosfære. Denne blandingen ble deretter oppvarmet til en temperatur på 60°C. Denne formyleringsreaksjonen ble fulgt med HPLC. Etter 16 timer kunne ingen 5,6,7,8-tetrahydrofolsyre lenger påvises.

Deretter ble reaksjonsblandingen avkjølt til romtemperatur og fortynnet med 600 ml vann. Ved hjelp av tilsats av en vandig 25 % kalsiumhydroksydsuspensjon ble pH-verdien innstilt på en verdi på 9,0. Til denne til isbadtemperatur avkjølte blandingen ble det under omrøring tilsatt 2 liter aceton. Den derved fremstilte blandingen ble omrørt i 90 minutter. Det utfelte kalsium-N<sup>5</sup>-formyl-5,6,7,8-tetrahydrofolatet ble frafiltrert, vasket en gang med aceton og tørket ved en temperatur på 60°C under redusert trykk. Utbyttet av råprodukt utgjorde 42 g. HPLC-renheten for dette råproduktet utgjorde 90 %. (For HPLC-metodikken se: B.A. Allen, R.A. Newman, Journ. of Chromat. (1980) 190, side 241). Råproduktet ble omkrystallisert fra 160 ml vann. Utbyttet av høyrent produkt utgjorde 25 g. På dette høyrene produktet ble følgende analytiske data oppnådd:

H<sub>2</sub>O-innhold ifølge Karl-Fisher: 11,6 %

UV (H<sub>2</sub>O):  $\lambda_{\max} = 287 \text{ nm}$  ( $\epsilon = 28600$ )  
 $\lambda_{\min} = 247 \text{ nm}$   
 $A_{\max} / A_{\min} = 5,1$

172492

5

HPLC-innhold: 100,0 % (relativt til USP-standard)

$[\alpha]_D^{25^\circ} = +17,2^\circ$  (c=1, H<sub>2</sub>O)

Elementanalyse (korrigert med hensyn på H<sub>2</sub>O-innhold):

5

|            | beregnet (%) | funnet (%) |
|------------|--------------|------------|
| karbon     | 46,96        | 47,23      |
| hydrogen   | 4,14         | 4,08       |
| nitrogen   | 19,17        | 19,01'     |
| 10 kalsium | 7,84         | 7,67       |

15

20

25

30

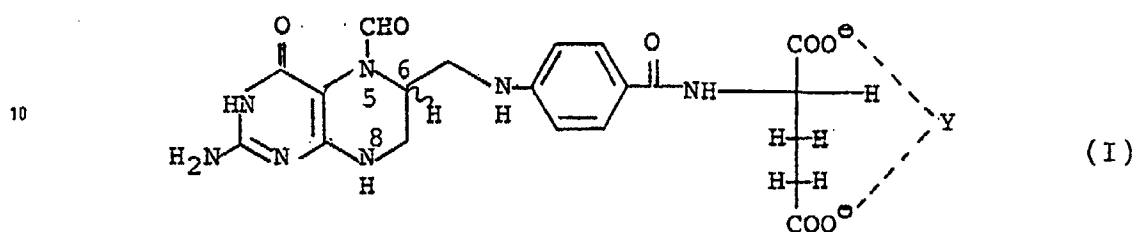
35



P a t e n t k r a v

1.

Fremgangsmåte for fremstilling av alkalimetall- eller  
 5 jordalkalimetallsalter av N<sup>5</sup>-formyl-5,6,7,8-tetrahydrofolsyre  
 med formel I



15 hvori

Y betyr to alkalimetallkationer eller ett jordalkalimetall-  
 kation, spesielt Ca<sup>2+</sup> eller Mg<sup>2+</sup>,

k a r a k t e r i s e r t v e d at man blander 5,6,7,8-  
 tetrahydrofolsyre med minst ett oppløsningsmiddel L<sub>1</sub>,

20 deretter blandes denne blanding A med formamid som formyler-  
 ingsmiddel,

deretter oppvarmes den derved fremstilte blanding B til en  
 temperatur på 45°C til 75°C, fortrinnsvis på 55°C til 65°C,  
 spesielt 60°C,

25 deretter avkjøles denne blanding B til romtemperatur og  
 blandes med vann,

deretter tilsettes en tilsvarende alkalimetall- eller  
 jordalkalimetallbase, eksempelvis i form av et hydroksyd,  
 karbonat eller hydrogenkarbonat, i en slik mengde at det  
 30 oppnås en målt pH-verdi på 7,5 til 10,0, fortrinnsvis 9,0,

deretter tilsettes til denne blanding C, som tilsvarer en  
 volumdel, 1,5 til 3 volumdeler av minst ett polart, med vann  
 blandbart, organisk oppløsningsmiddel L<sub>2</sub>, fortrinnsvis etanol  
 eller aceton, fortrinnsvis under omrøring ved en temperatur  
 35 på 0°C til 10°C, spesielt i 30 til 90 minutter, og

deretter fraskilles det utfelte alkalimetall- eller jord-  
 alkalimetallsaltet med formel I og omkrystalliseres fra vann.

2.

5 Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t  
v e d at man i det minste gjennomfører formyleringsreak-  
sjonen under utelukkelse av oksygen, spesielt under en  
inertgassatmosfære.

3.

10 Fremgangsmåte ifølge et av kravene 1 til 2, k a r a k-  
t e r i s e r t v e d at oppløsningsmidlet  $L_1$  er et  
polart, med vann blandbart, organisk oppløsningsmiddel,  
fortrinnsvis dimetylsulfoksyd, dimetylformamid, formamid,  
dimetylacetamid, N-metyl-pyrrolidon.

15 4.

Fremgangsmåte ifølge et av kravene 1 til 3, k a r a k-  
t e r i s e r t v e d at formyleringsreaksjonen gjennom-  
føres i nærvær av minst ett antioksydasjonsmiddel, spesielt i  
en mengde på 1 volum-%, beregnet på basis av volumet av den  
20 samlede blandingen, spesielt med en merkaptan, eksempelvis 2-  
merkaptoetanol eller ditiothreitol.

25

30

35